

Title	Functional characterization of the HNF4 α isoform (HNF4 α 8) expressed in pancreatic β -cells
Author(s)	井原, 亜里砂
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46214
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 井 原 亜 里 紗

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19712 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 5 月 17 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 Functional characterization of the HNF4 α isoform (HNF4 α 8)
expressed in pancreatic β -cells
(膵 β 細胞における HNF4 α アイソフォーム (HNF4 α 8) の機能解析)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 下村伊一郎

(副査)
教 授 宮崎 純一 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

MODY (maturity-onset diabetes of the young) は常染色体優性遺伝形式を示し、通常 25 才以下の若年で発症する糖尿病であり、インスリン分泌不全を特徴とする。MODY の一亜型である MODY1 は核内受容体型転写因子である hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) の遺伝子異常により発症する。HNF4 α は肝細胞や膵 β 細胞に発現しているが、MODY1 患者ではインスリン分泌不全型の糖尿病以外の異常は認められない。HNF4 α には N 端および C 端の異なる 9 種類のアイソフォームが存在しており、肝においては HNF4 α 2 が主に発現しているが、膵においては N 端側の A/B 領域の構造が HNF4 α 2 と異なる HNF4 α 8 が発現している。しかし HNF4 α 2 と HNF4 α 8 の機能的特徴の違いは不明である。本研究では膵 β 細胞における HNF4 α 8 の発現量および機能について検討を行った。

〔方法ならびに成績〕

1. 膵 β 細胞における HNF4 α 発現量の検討

マウス膵島、肝臓および培養細胞 (INS-1、HepG2) より蛋白質を抽出し、HNF4 α の N 端および C 端を認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。膵島および膵 β 細胞株である INS-1 細胞には HNF4 α 8 が発現していたが、HNF4 α の発現量は肝の約 13% であった。免疫組織学的検討でも HNF4 α の発現は肝に比して低値であった。

2. HNF4 α 8 転写活性の検討

HNF4 α 2 および HNF4 α 8 発現ベクターを作製し、HeLa 細胞および INS-1 細胞に遺伝子導入後、リポーター遺伝子を用いて転写活性について検討を行った。HNF4 α 8 と HNF4 α 2 は同程度発現していることが確認されたが、HNF4 α 8 の転写活性は HNF4 α 2 に比して 1.1-1.7% であった。日本人 MODY1 患者で同定された R127W 変異を導入した R127W-HNF4 α 8 の転写活性は野生型 HNF4 α 8 の約 3 分の 1 であった。

3. DNA 結合能の検討

HNF4 α 結合配列を用いたゲルシフトアッセイにより HNF4 α 8 と HNF4 α 2 の DNA 結合能について検討した

ところ、両者の結合能は同程度であった。

4. A/B 領域の転写活性の検討

HNF4 α 2 の N 側 (A/B 領域) には転写活性を有する activation function (AF)-1 が存在する。HNF4 α 8 の N 側のアミノ配列は HNF4 α 2 と異なるため、HNF4 α 8 が AF-1 活性を有するか検討を行った。GAL4 DNA binding domain と HNF4 α 2 および HNF4 α 8 の A/B ドメインの融合蛋白発現ベクターを作製し、INS-1 細胞に遺伝子導入しルシフェラーゼアッセイにて検討したところ、HNF4 α 8 の A/B ドメインは AF-1 活性を有さないことが判明した。

5. F 領域による HNF4 α 転写活性制御の検討

HNF4 α 2 の C 側に位置する F 領域は転写活性を負に制御している。HNF4 α 8 の F 領域にも同様の働きがあるか、F 領域の欠損変異体を作製し検討を行った。HNF4 α 8 の F 領域欠損変異体の発現ベクターを作製し、INS-1 細胞に遺伝子導入を行った。変異体の転写活性は野生型 HNF4 α 8 に比して 3 倍に増加しており、F 領域は HNF4 α 8 転写活性を負に制御していることが判明した。

[総括]

今回の検討で、膵 β 細胞における HNF4 α 発現量は肝に比して少なく、また、発現しているアイソフォームの転写活性も低いことが判明した。膵における HNF4 α のトータルの活性が著しく低いことが、遺伝子異常によりインスリン分泌不全型の糖尿病が発症することに関連している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

核内受容体型転写因子である hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) の遺伝子異常によりインスリン分泌不全を伴う 2 型糖尿病 (MODY1) が発症するがその発症機序は不明である。本研究は膵 β 細胞における HNF4 α の発現量、転写活性につき検討したものである。申請者は膵 β 細胞における HNF4 α の発現量について蛋白レベルで検討を行い、その発現量が肝臓に比して低値であることを明らかにすると共に、肝で主に発現しているのとは異なった HNF4 α アイソフォーム (HNF4 α 8) が発現していることを見出した。更に HNF4 α 8 の転写活性が肝に発現しているアイソフォームに比して著しく低いことを明らかにした。本研究は、MODY1 発症機構の理解する上で極めて重要な知見を示したものであり、意義深く学位に値するものである。